

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000454

International filing date: 18 February 2005 (18.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0013086
Filing date: 26 February 2004 (26.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 June 2005 (30.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office

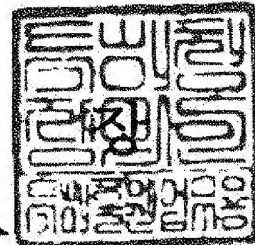
출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0013086 호
Application Number 10-2004-0013086

출 원 일 자 : 2004년 02월 26일
Date of Application FEB 26, 2004

출 원 인 : 제노마인(주) 외 1 명
Applicant(s) GENOMINE INC., et al

2005 년 06 월 09 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.02.26
【발명의 국문명칭】	신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드, 그 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도
【발명의 영문명칭】	Polypeptide Having Function of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase, Polynucleotide Coding the Polypeptide and Their Use
【출원인】	
【명칭】	제노마인(주)
【출원인코드】	1-1999-062412-6
【출원인】	
【명칭】	한국화학연구원
【출원인코드】	3-1998-007765-1
【대리인】	
【성명】	조흥오
【대리인코드】	9-2000-000204-1
【포괄위임등록번호】	2004-012101-7
【대리인】	
【성명】	강경찬
【대리인코드】	9-2001-000096-7
【포괄위임등록번호】	2004-011054-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이동희
【성명의 영문표기】	LEE, Dong-hee

【주민등록번호】 650404-1101511

【우편번호】 614-871

【주소】 부산광역시 부산진구 초읍동 252-1 반도맨션 410호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김태훈

【성명의 영문표기】 KIM,Tae-hoon

【주민등록번호】 730716-1122320

【우편번호】 609-320

【주소】 부산광역시 금정구 부곡동 264-8

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 황인택

【성명의 영문표기】 HWANG, In-taek

【주민등록번호】 571225-1495611

【우편번호】 305-755

【주소】 대전광역시 유성구 어은동 99 한빛아파트 115-303

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 조광연

【성명의 영문표기】 CHO,Kwang-yun

【주민등록번호】 460326-1046511

【우편번호】 305-340

【주소】 대전광역시 유성구 도룡동 383-21

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 최정섭

【성명의 영문표기】 CHOI,Jung-sup

【주민등록번호】	640210-1474518
【우편번호】	305-707
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 한올아파트 102-1106
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이관휘
【성명의 영문표기】	LEE, Kwan-hwi
【주민등록번호】	720525-1449516
【우편번호】	305-720
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 대림두레아파트 105-503
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김범태
【성명의 영문표기】	KIM, Bum-tae
【주민등록번호】	561230-1006416
【우편번호】	305-761
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 102동 505호
【국적】	KR
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	6
【서열목록의 전자문서】	첨부
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 오 (인) 대리인 강경찬 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	45 면 38,000 원

【가산출원료】	0	면	0	원
【우선권주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	0	항	0	원
【합계】	38,000	원		
【감면사유】	정부출연연구기관			
【감면후 수수료】	19,000	원		

【요약서】

【요약】

본 발명은 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드, 그 폴리뉴클레오티드 및 그 용도를 개시한다. 보다 구체적으로 본 발명은 리그닌 생합성에 관여하는 신나밀 알콜 탈수소화 기능을 가지는 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터, 이러한 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체, 식물의 생장을 억제하는 방법, 식물의 생장을 억제하는 물질의 스크리닝 방법, 및 상기 스크리닝 방법을 통하여 얻어진 물질을 포함하는 식물의 생장 억제용 조성물을 개시한다.

【대표도】

도 1

【색인어】

리그닌 생합성, 신나밀 알콜 탈수소화 효소, 폴리펩티드, 식물의 생장 억제

【명세서】

【발명의 명칭】

신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드, 그 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도{Polypeptide Having Function of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase, Polynucleotide Coding the Polypeptide and Their Use}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 본 발명의 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 용출액의 각 분액에 대한 SDS-PAGE 분석 결과를 나타낸 것이다.
- <2> 도 2a는 기질인 코니페알데히드(coniferaldehyde)에 대한 정제된 단백질의 기질 특이 효소 활성도를 측정하기 위하여, 기질의 농도 변화에 따른 반응속도를 측정하여 이중역수도표(Lineweaver-Burk plot)로 나타낸 것이다.
- <3> 도 2b는 역반응에 대한 기질인 코니페릴 알콜(coniferyl alcohol)에 대한 정제된 단백질의 기질 특이 효소 활성도를 측정하기 위하여, 기질의 농도 변화에 따른 반응속도를 측정하여 이중역수도표(Lineweaver-Burk plot)로 나타낸 것이다.
- <4> 도 3a는 본 발명의 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 안티센스 방향으로 도입될 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.

<5> 도 3a는 본 발명의 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 안티센스 방향으로 도입된 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.

<6> 도 4a는 본 발명의 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 안티센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대의 종자에서 자란 묘목인 *Atcad-H1*의 사진이다.

<7> 도 4b는 본 발명의 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 특히 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드가 안티센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대의 종자에서 자란 묘목인 *Atcad-H6*의 사진이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<8> 본 발명은 리그닌 생합성에 관여하는 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드, 그 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도에 관한 것이다.

<9> 리그닌은 식물체의 기계적 지지를 담당하는 성분으로서, 생물학적으로 볼 때 식물체에 없어서는 안 되는 성분이다. 리그닌은 또한 병원균의 침입과 증식에 대한 물리적인 장벽으로 기능함으로써 식물체의 질병 저항성을 높여주는 작용을 갖고 있

기도 하다.

<10> 리그닌이 담당하고 있는 상기와 같은 역할 때문에, 모든 식물체에는 인간이나 동물에는 존재하지 않는 리그닌 생합성 과정이 필수적으로 존재하고 있다.

<11> 이러한 리그닌의 생합성 과정은 일련의 과정을 거쳐 진행되게 되는데, 먼저 전구물질인 L-페닐알라닌(L-phenylalanine)이 페닐알라닌 암모니아 리아제(phenylalanine ammonia-lyase), 신나메이트 4-히드록시라제(cinnamate 4-hydroxylase), 4-히드록시신나메이트 3-히드록시라제(4-hydroxycinnamate 3-hydroxylase), 0-메틸트랜스퍼라제(0-methyltransferase), 페루레이트 5-히드록시라제(ferulate 5-hydroxylase), 히드록시신나메이트 CoA-리가제(hydroxycinnamate CoA-ligase) 등의 효소들에 의해서, 쿠마르산(coumaric acid), 페루산(ferulic acid) 및 시나프산(sinapic acid)을 형성하는 과정이다. 이 과정이 바로 페닐프로파노이드 경로(phenylpropanoid pathway)인데, 이는 일반적인 경로로서 리그닌 생합성에 특이적인 경로는 아니다.

<12> 다음은 상기 산들이 신나모일 CoA 리덕타제(cinnamoyl CoA reductase(CCR))에 의해서 신남알데히드(cinnamaldehydes), 즉 코니페알데히드(coniferaldehyde), 쿠움알데히드(coumaldehyde), 시납알데히드(sinapaldehyde)로 환원되고, 그 신남알데히드가 신나밀 알콜 탈수소화 효소(cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD))에 의해서 모노리그놀인 신나밀 알콜, 즉 코니페릴 알콜(coniferyl alcohol), 쿠마릴 알콜(p-coumaryl alcohol) 및 시나필 알콜(sinapyl alcohol)로 전환되는 과정이다. 이 과정은 리그닌 생합성에 특이적인 경로이다. 위 신나밀 알콜은 최종적으로 과산

화효소(oxidase), 락케이즈(laccase) 등에 의해서 리그닌으로 합성되게 된다.

<13> 리그닌의 생합성 과정이 이러하기 때문에, 위 리그닌 생합성의 특이적 경로에 관여하고 있는 신나밀 알콜 탈수소화 효소의 기능이 저해되게 되면 리그닌 생합성이 저해될 가능성이 있다. 이는 리그닌은 식물체 있어서 생물학적으로 그 중요성이 크기 때문에 리그닌 생합성의 저해가 식물의 생장 저해로 이어질 수 있음을 시사하는 것이다.

<14> 본 발명자들은 이처럼 신나밀 알콜 탈수소화 효소가 리그닌 생합성의 특이적인 경로에 관여하는 효소라는 점에 착안하여 신나밀 알콜 탈수소화 효소의 기능이 저해될 경우 결국 식물의 생장 저해로 이어질 수 있다는 기대를 가지고, 애기장대로부터 위 효소의 기능을 가지는 관련 폴리펩티드와 폴리뉴클레오티드를 분리하고, 안티센스 기술을 이용하여 그 폴리펩티드의 발현을 저해시켜 본 결과 애기장대의 생장이 저해됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<15> 따라서 본 발명의 목적은 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드를 제공하는데 있다.

<16> 본 발명의 다른 목적은 상기 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는데 있다.

<17> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드를 제공하는데 있다.

<18> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터 및 이러한 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는데 있다.

<19> 본 발명의 또 다른 목적은 식물의 생장을 억제하는 방법을 제공하는데 있다.

<20> 본 발명의 또 다른 목적은 식물의 생장을 억제하는 물질의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

<21> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 스크리닝 방법을 통하여 얻어진 물질을 포함하는 식물의 생장 억제용 조성물을 제공하는데 있다.

【발명의 구성】

<22> 본 발명은 일 측면에 있어, 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드를 제공한다.

<23> 본 발명자들은 다음의 과정을 거쳐 상기 폴리펩티드의 기능을 확인하였다. 먼저 애기장대의 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가진 단백질을 암호화한다고 추정되는 유전자(Genebank accession number NM 121949)의 염기서열을 기초로 하여 프라이머를 제작하고 애기장대로부터 전장의 cDNA를 얻었다. 다음 그 cDNA의 염기서열에 기초하여 전사 해독 틀(Open Reading Frame)을 분석한 결과, 상기 cDNA가 코딩하는 폴리펩티드의 분자량을 추정할 수 있었고, 그 추정된 분자량의 폴리펩티드가 상기 cDNA를 포함하는 재조합 발현 벡터로 형질전환된 대장균에서 얻어짐을 확인할 수 있었다. 나아가 이러한 대장균에서 얻어진 폴리펩티드는 코니페알데히드에서 코니페닐 알콜로의 전환 과정에 관여함을 확인할 수 있었다.

<24> 따라서, 본 발명에서 신나밀 알콜 탈수소화 효소는 세 가지의 모노리그놀인 신나밀 알콜, 즉 코니페릴 알콜, 쿠마릴 알콜 및 시나필 알콜 중 코니페릴 알콜의 생합성에 관여하는 효소로서 코니페알데히드에 대한 기질 특이성을 갖는 효소로서 정의되는 것이 바람직하다. 더 바람직하게는 코니페알데히드 및 역반응 기질인 코니페릴 알콜에 대한 기질 특이성을 갖는 효소로 정의될 수 있다. 더욱 바람직하게는 코니페알데히드에 대한 기질 친화도가 코니페릴 알콜에 대한 기질 친화도 보다 더 높은 효소로 정의될 수 있다.

<25> 본 발명의 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 갖는 폴리펩티드는 다음의 폴리펩티드 중의 하나이다.

<26> (a) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드;

<27> (b) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드;

<28> (c) 상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드

<29> 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 비교하였을 때 여전히 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 보유한다고 보기에 충분한 정도의 서열번호 2의 아미노산 서열의 일부분을 포함하는 폴리펩티드로서 정의된다. 여전히 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 보유한다면 충분하므로, 상기 폴리펩티드의 길이 그리고 그러한 폴리펩티드가 가지

는 활성의 정도는 특별히 문제되지는 않는다. 즉 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 활성이 낮더라도, 여전히 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 보유하는 폴리펩티드라면 그 길이야 어떻든 상기 '서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드'에 포함된다는 것이다. 통상의 당업자라면, 즉 본 출원시를 기준으로 공지된 관련 선행기술을 평균적으로 숙지하고 있는 자라면, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에서 일부분이 결실되더라도 그러한 폴리펩티드는 여전히 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가질 것이라고 기대할 것이다. 그러한 폴리펩티드로서 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에서 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실된 폴리펩티드를 들 수 있다. 그것은 일반적으로 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실되더라도 그러한 폴리펩티드는 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 가진다고 당업계에 공지되어 있기 때문이다. 물론 경우에 따라서는, N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 효소의 기능에 필수적인 모티프에 관여함으로써 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실된 폴리펩티드가 상기 효소의 기능을 나타내지 않는 경우가 있을 수 있겠지만, 그럼에도 그러한 비활성의 폴리펩티드를 활성의 폴리펩티드와 구분하고 검출해내는 것은 당업자의 통상의 능력 범위 내에 속한다. 나아가 N-말단 부분 또는 C-말단 부분뿐만 아니라 그 이외의 다른 부분이 결실되더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 가질 수 있다. 여기서도 당업자라면 그의 통상의 능력의 범위 내에서 이러한 결실된 폴리펩티드가 여전히 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 가지는가를 충분히 확인할 수 있을 것이다. 특히 본 명세서가 서열번호

1의 염기서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 개시하고 있고 나아가 서열번호 1의 염기서열에 의해 암호화되고 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드가 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는가를 분명히 확인한 실시예를 개시하고 있다는 점에서, 서열번호 2의 아미노산 서열에서 일부 서열이 결실된 폴리펩티드가 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것인가를 당업자는 그의 통상의 능력 범위 내에서 충분히 확인할 수 있다는 것이 매우 자명해진다. 그러므로 본 발명에 있어서 상기 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"는 상기 정의와 같이 본 명세서의 개시 내용에 기초하여 당업자가 그의 통상의 능력 범위 내에서 제조 가능한 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 결실된 형태의 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미로서 이해되어야 한다.

<30> 또한 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"란 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하지만, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 가지는 기능, 즉 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 여전히 보유하는 폴리펩티드를 말한다. 여기서도 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 여전히 보유하기만 한다면 그러한 폴리펩티드가 가지는 활성의 정도나 아미노산이 치환된 비율은 문제되지 않는다. 바꿔 얘기해서, 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 그 활성이 아무리 낮더라도 또 많은 수의 치환된 아미노산을 포함하고

있다고 하더라도 그러한 폴리펩티드가 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 보유하기만 한다면 본 발명에 포함된다는 것이다. 하나 이상의 아미노산이 치환되더라도 치환되기 전의 아미노산이 치환된 아미노산과 화학적으로 등가라면, 그러한 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드는 여전히 본래의 폴리펩티드의 기능을 보유할 것이다. 예컨대, 소수성 아미노산인 알라닌이 다른 소수성의 아미노산, 예를 들면 글리신, 또는 보다 더 소수성인 아미노산, 예를 들면 발린, 류신 또는 이소류신으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드는 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 마찬가지로, 음으로 하전된 아미노산 예컨대, 글루탐산이 다른 음으로 하전된 아미노산, 예컨대 아스파르산으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드도 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이며, 또한 양으로 하전된 아미노산, 예컨대 아르기닌이 다른 양으로 하전된 아미노산, 예컨대, 리신으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드 또한 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 또한 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 부분에서 치환된 아미노산(들)을 포함하는 폴리펩티드도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 당업자라면, 그 전술한 바의 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하면서도, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 가지는 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 여전히 보유하는 폴리펩티드를 제조할 수 있다. 또한 당업자라면 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 여전히 위 기능을 가지는가를 확인할 수 있다. 더구

나 본 명세서가 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 개시하고 있고 또한 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 지님을 확인한 실시예를 개시하고 있기 때문에, 본 발명의 "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 당업자에게 용이하게 실시 가능한 것임이 분명하다. 그러므로 "상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하면서도 여전히 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미로서 이해되어야 한다.

<31> 이처럼 "상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하면서도 여전히 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미이지만, 그럼에도 활성의 정도라는 관점에서 봤을 때, 상기 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 서열 상동성이 높을수록 바람직하다. 상기 폴리펩티드는 서열 상동성의 하한에 있어서 60% 이상의 서열 상동성을 지니는 것이 바람직한 반면, 서열 상동성의 상한에 있어서는 당연히 100%의 서열 상동성을 지니는 것이 바람직하다.

<32> 보다 더 구체적으로 위 서열 상동성은 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 99.6 %의 순서대로 높아질수록 바람직하다. 여기서 99.6%의 서열 상동성은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에서 하나의 아미노산

이 치환된 경우이다.

<33> 그리고 본 발명의 "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 '서열번호 2의 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드' 뿐만 아니라 '서열번호 2의 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드'를 포함하므로 전술한 바의 모든 설명은 '서열번호 2의 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드'에 대해서 뿐만 아니라 '서열번호 2의 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드'에 대해서도 적용되어진다.

<34> 본 발명은 다른 측면에 있어서, 전술한 바의 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 대한 것이다. 여기서 "전술한 바의 폴리펩티드"란 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 지니면서 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드, 및 위 폴리펩티드들과 실질적으로 유사한 폴리펩티드를 포함할 뿐만 아니라, 전술한 바의 바람직한 양태의 모든 폴리펩티드들을 포함하는 의미이다. 그러므로 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 지니면서, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체 또는 그 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드 및 이러한 폴리펩티드들에 실질적으로 유사한 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하며,

나아가 바람직한 양태로서 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 지니면서 전술한 바의 서열 상동성의 순서대로 그 서열 상동성을 지니는 모든 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 아미노산 서열이 밝혀졌을 때, 그러한 아미노산 서열에 기초하여 그러한 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 당업자라면 용이하게 제조할 수 있다.

<35> 한편, 상기 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 청구범위를 포함하는 이하에서, 화학적으로 합성된 폴리뉴클레오티드, 생물체 특히 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 분리된 폴리뉴클레오티드 및 변형된 뉴클레오티드를 함유한 폴리뉴클레오티드를 모두 포함하며, 단일 가닥 또는 이중 가닥의 RNA 또는 DNA의 중합체를 모두 포함하는 것으로서 정의된다. 그러므로 상기 "단리된 폴리뉴클레오티드"란 cDNA를 포함하여 뉴클레오티드들을 화학적으로 중합시킨 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라, 나아가 생물체 특히 애기장대에서 분리되는 gDNA를 포함한다. 여기서, 본 명세서가 개시하고 있는 서열번호 2의 아미노산 서열, 이를 코딩하는 서열번호 1의 염기서열, 및 당업계에 공지된 기술 등에 기초하는 한, cDNA를 포함하여 상기 화학적 합성되는 폴리뉴클레오티드의 제조 및 상기 gDNA의 분리 등은 당업자의 통상의 능력 범위 내에 속할 것이다.

<36> 본 발명은 또 다른 측면에 있어서, 전술한 바의 폴리뉴클레오티드에 상보적으로 결합할 수 있는 안티센스 뉴클레오티드에 대한 것이다.

<37> 상기 안티센스 뉴클레오티드는 전술한 바의 폴리뉴클레오티드에 상보적으로

결합하여 전사(transcription)(폴리뉴클레오티드가 DNA인 경우) 또는 번역(translation)(폴리뉴클레오티드가 RNA인 경우)을 저해할 수 있는 모든 폴리(또는 올리고)뉴클레오티드를 포함한다. 이러한 안티센스 뉴클레오티드는 전술한 바의 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 지니는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 상보적으로 결합하여 전사(transcription)(폴리뉴클레오티드가 DNA인 경우) 또는 번역(translation)(폴리뉴클레오티드가 RNA인 경우)을 저해할 수 있다면, 그 길이라든지 그 상보적인 서열 상동성은 문제되지 않는다. 짧은 길이, 예컨대 30개 뉴클레오티드 정도의 폴리뉴클레오티드라고 하더라도 그것의 해당 유전자(DNA 및 RNA 포함)에 100%의 상보적인 서열 상동성을 지니고 기타의 조건 예컨대 농도나 pH 등이 적절하게 갖추어진다면 안티센스 뉴클레오티드로서 작용할 수 있다. 또 서열에 있어서도 그것의 해당 유전자와 100%의 상보적인 서열 상동성을 지니지 않더라도 적당한 크기의 길이를 갖는다면 마찬가지로 안티센스 뉴클레오티드로서 작용할 수 있다. 그러므로 안티센스 뉴클레오티드의 길이, 상보적인 서열 상동성의 정도에 상관없이 안티센스 뉴클레오티드로서 작용할 수 있다면, 즉 해당 유전자의 전사 또는 번역을 저해할 수 있는 능력을 보유하고 있다면, 모두 본 발명의 안티센스 뉴클레오티드에 포함되는 것으로 간주되어야 한다. 여기서 안티센스 뉴클레오티드로서 필요한 길이의 결정, 해당 유전자와 상보적인 서열 상동성의 정도, 그리고 그러한 안티센스 뉴클레오티드의 제조 방법 등은 본 명세서가 개시하고 있는 서열번호 1의 염기서열, 서열번호 2의 아미노산 서열 및 당입계에 공지된 기술에 기초하는 한 모두 당업자의 통상의 능력 범위 내에 속할 것이다.

<38> 한편, 바람직하게는, 상기 안티센스 뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기서열의 일부분에 상보적인 부분을 포함하는 안티센스 뉴클레오티드가 바람직할 것이다. 여기서 "서열번호 1의 염기서열의 일부분에 상보적인 부분"이란 이미 전술한 바를 고려한다면, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 DNA 또는 그것으로부터 전사된 RNA와 상보적으로 결합하여 그 전사 또는 번역을 방해하기 충분한 길이를 포함하는 것으로 이해될 수 있다.

<39> 본 발명은 또 다른 측면에 있어, 전술한 바의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터 및 이러한 재조합 벡터로 형질 전환된 형질전환체에 대한 것이다.

<40> 하기 본 발명의 실시예에서는, 서열번호 1에 기재된 염기서열로 이루어진 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 pCAL-n(Stratagene, USA)에 삽입하여 제작된 재조합 벡터를 pCatCAD-H로 명명하고, 이러한 pCatCAD-H 재조합 벡터를 대장균에 형질 전환시킨 후, 위 폴리뉴클레오티드로부터 발현된 폴리펩티드를 분리해내고, 그 분자량을 확인한 결과, 서열번호 1의 염기서열의 전사 해독 틀(ORF)로부터 추정된 분자량과 동일함을 확인할 수 있었다.

<41> 이러한 본 발명의 바람직한 실시 양태를 고려할 때, 상기 재조합 벡터는 pCatCAD-H인 것이 바람직할 것이고, 또한 본 발명의 형질전환체는 상기 재조합 벡터로 형질전환된 대장균인 것이 바람직할 것이다.

<42> 본 발명은 또 다른 측면에 있어서, 식물의 생장을 억제하는 방법을 제공한다. 구체적으로 본 발명의 식물의 생장을 억제하는 방법은 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 그와 유사한 서열로 이루어진 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드의 발현 또는 기능을 억제하는 단계를 포함함을 특징으로 한다.

<43> 전술하였지만, 신나밀 알콜 탈수소화 효소는 리그닌의 생합성에 특이적인 반응을 매개하는 효소이다. 그리고 리그닌은 식물에 있어 필수적인 성분이다. 따라서 신나밀 알콜 탈수소화 효소가 발현되지 않거나 그 기능이 억제되게 되면 리그닌의 생합성이 저해되게 되고, 결국 식물의 생장의 억제로 이어질 수 있다. 본 발명의 실시예가 개시하는 바와 같이, 실제 서열번호 1의 염기서열에 상보적인 안티센스 뉴클레오티드를 애기장대에 형질 전환시켰을 때, 형질 전환된 애기장대에서 생장이 지체되는 현상 등을 발견할 수 있었다. 그러므로 본 발명의 식물의 생장을 억제하는 방법은 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드의 발현을 억제하거나 그 기능을 억제함으로써 가능해지는 것이다.

<44> 한편, 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, "서열번호 2의 아미노산 서열과 유사한 서열로 이루어진 폴리펩티드"란 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드의 동족체로서 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 지니면서, 식물체의 종류에 따른 진화적 경로의 상이로 인하여 서열번호 2의 아미노산 서열과 달라지는 서열로 이루어진 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미이다. 그러므로 상기 본 발명의 식물의 생장을 억제하는 방법에 있어서, 서열번호 2의 아미노산 서열로

이루어진 폴리펩티드가 비록 애기장대에서 분리된 것이라 하더라도, 상기 식물의 범위에는 애기장대뿐만 아니라 기타의 모든 식물이 포함되는 것으로 이해되어야 한다. 다만, 여기서 서열번호 2의 아미노산 서열과 유사한 서열로 이루어진 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 서열 상동성이 높을수록 바람직하고, 가장 바람직하게는 당연히 100%의 서열 상동성을 지닐 때이다. 한편, 서열 상동성의 하한에 있어서는 상기 폴리펩티드가 서열번호 2의 아미노산 서열과 60% 이상의 서열 상동성을 지니는 경우가 바람직할 것이다. 보다 더 구체적으로는 위 서열 상동성이 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 99.6 %의 순서대로 높아질수록 바람직하다.

<45> 한편, 상기에서 폴리펩티드의 발현 억제는 당업계에 공지된 방법으로 충분히 가능하다. 즉, 안티센스 뉴클레오티드 도입, 유전자 제거(gene deletion), 유전자 삽입(gene insertion), T-DNA 도입, 동종 재조합(homologous recombination) 또는 트랜스포전 태깅(transposon tagging), siRNA (small interfering RNA) 등의 방법이 이용될 수 있다.

<46> 하기 본 발명의 실시예에서는 안티센스 뉴클레오티드를 식물체내에 도입하는 방법을 이용하였는데, 구체적으로는, 먼저 서열번호 1의 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드를 제조한 다음 이를 포함하는 재조합 벡터(pSEN-antiAtCAD-H 벡터)를 제작하고, 그 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시

엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 형질전환시킨 후 이 형질전환체를 애기장대에 형질전환시키는 과정을 거쳤다. 그 형질전환된 애기장대의 종자를 육종한 결과, 모두 생장이 현저히 저하되는 현상 등을 확인할 수 있었다(하기 실시예 4 참조).

<47> 그러므로 본 발명의 식물의 생장을 억제하는 방법에 있어, 상기 단계는 서열 번호 1의 염기서열의 일부분에 상보적인 부분을 포함하는 안티센스 뉴클레오티드를 해당 식물체내에 도입하는 단계를 포함하는 것이 바람직할 것이고, 상기 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 식물체내로 도입하는 단계를 포함하는 것이 더욱 바람직할 것이고, 특히 위 형질전환체는 위 재조합 벡터로 형질 전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스인 것이 더욱 바람직할 것이다. 여기서 "서열번호 1의 염기서열의 일부분에 상보적인 부분"이란 상기 본 발명의 안티센스 뉴클레오티드와 관련하여 설명한 바와 같다.

<48> 일반적으로 안티센스 뉴클레오티드는 핵산(RNA 또는 DNA)내 표적 뉴클레오티드 배열과 결합하여, 상기 핵산의 기능 또는 합성을 억제하는 역할을 한다고 알려져 있다. 즉, 어떤 특정한 유전자에 상응하는 안티센스 뉴클레오티드는 RNA 및 DNA 양자 모두에 혼성화하는 능력을 지님으로써, 전사(transcription) 또는 번역(translation) 과정에서 특정 유전자의 발현을 저해하는 것이다.

<49> 따라서, 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 그와 유사한 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드의 발현 억제나 그 기능 억제를 통하여 신나밀 탈수소화 효소의 기능이 저해되면 결과적으로 리그닌의 생합성이 저해되게 되어 식물의 생장이 억제될 수 있다.

<50> 본 발명의 식물의 생장을 억제하는 방법은 식물에만 존재하는 리그닌의 생합성 과정을 저해시키는 기작을 이용한다는 점에서 리그닌 생합성 과정이 존재하지 않는 인간이나 동물에게는 특별히 해를 주지 않는 방법이 될 수 있다.

<51> 본 발명은 또 다른 측면에 있어서, 식물의 생장을 억제하는 물질의 스크리닝 방법에 대한 것이다. 상기 방법은 서열번호 2의 아미노산 서열 및 그와 유사한 서열로 이루어진 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드의 발현 또는 그 기능을 억제하는 물질을 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

<52> 상기에서 그리고 청구범위를 포함하는 이하에서, 서열번호 2의 아미노산 서열과 유사한 서열로 이루어진 폴리펩티드란 상기 본 발명의 식물의 생장을 억제하는 방법에서 설명한 바가 그대로 적용되어질 것이고, 위 폴리펩티드의 발현을 억제하는 물질로서는 이미 전술한 바 있는 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드를 들 수 있을 것이다.

<53> 한편, 상기 폴리펩티드의 발현을 억제하는 물질은 본 발명의 식물의 생장을 억제하는 방법과 관련하여 이미 설명한 바의 이유에서 서열번호 1의 염기서열의 일 부분에 상보적인 부분을 포함하는 안티센스 뉴클레오티드인 것이 바람직할 것이고, 상기 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체인 것이 더욱 바람직할 것이며, 특히 위 재조합 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스인 것이 더더욱 바람직할 것이다. 여기서도 "서열번호 1의 염기서열의

일부분에 상보적인 부분"이란 상기 본 발명의 안티센스 뉴클레오티드와 관련하여 설명한 바와 같다.

<54> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 스크리닝 방법을 통하여 얻어진 물질을 포함하는 식물의 생장 억제용 조성물에 대한 것이다.

<55> 이러한 식물의 생장 억제용 조성물은 인간 및 동물에 해를 주지 않으면서 식물의 생장을 억제하는 효과를 지닐 것으로 기대된다. 그것은 본 발명의 식물의 생장 억제용 조성물이 인체에 무해하고 환경친화적인 제초제로서 이용될 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있다.

<56> 한편, 상기에서 상기 스크리닝 방법을 통하여 얻어진 물질은 앞서 전술한 바의 안티센스 뉴클레오티드인 것이 바람직하고, 특히 서열번호 1의 염기서열의 일부분에 상보적인 부분을 포함하는 안티센스 뉴클레오티드인 것이 바람직할 것이다. 또한 상기 물질은 상기 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체인 것이 더욱 바람직할 것이며, 또한 그 형질전환체는 위 재조합 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스인 것이 바람직할 것이다. 여기서도 "서열번호 1의 염기서열의 일부분에 상보적인 부분"이란 상기 본 발명의 안티센스 뉴클레오티드와 관련하여 설명한 바와 같다.

<57> 이하, 본 발명을 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 이러한 실시예가 본

발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

<58> **<실시예 1> 애기장대로부터 신나밀 알콜 탈수소화 기능을 갖는 폴리펩티드를
암호화하는 유전자의 분리**

<59> 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를
애기장대로부터 분리하기 위한 스크리닝을 수행하였다.

<60> 1-1) 애기장대의 재배 및 배양

<61> 애기장대는 토양을 담은 화분에서 재배하거나, 2% 수크로즈(sucrose, pH
5.7)와 0.8% 아가(agar)가 포함된 MS(Murashige and Skoog salts, Sigma, USA) 배
지를 넣은 펠트리 디쉬에서 재배하였다. 화분에서 재배할 때는 22℃의 온도에서
16/8시간 명암 주기로 조절되는 생장 조절기(growth chambers)내에서 재배하였다.

<62> 1-2) RNA 추출과 cDNA 라이브러리의 제조

<63> 애기장대 cDNA 라이브러리를 만들기 위해서 여러 분화 단계의 애기장대 잎으
로부터 TRI 시약(Sigma, USA)을 사용하여 RNA를 추출하였고, 추출된 전체 RNA로부
터 mRNA 분리 키트(Pharmacia, USA)의 프로토콜에 따라 poly(A)+ RNA를
분리하였다. 프라이머(primer)로 *NotI*-(dT)₁₈을 이용하여 poly(A)+ RNA와 cDNA 합성
키트(Time Saver cDNA synthesis kit, Pharmacia, USA)로 이중 가닥의 cDNA를 제조
하였다.

<64> 1-3) 신나밀 알콜 탈수소화 기능을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자의 분리

<65> 애기장대의 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가진 단백질을 암호화한다고 추정되는 유전자(Genebank accession number NM 121249)의 염기서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고, 제한효소 *Bam*HI의 서열이 포함된 정방향 프라이머와 서열번호 4로 표시되고, 제한효소 *Hind*III의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 합성하였다. 상기 두 프라이머를 사용하여 상기 실시예 1-2)에서 제조된 애기장대 cDNA 라이브러리로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다.

<66> 상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 35.6kDa의 분자량을 갖고 326개의 아미노산을 암호화하는 981bp크기의 전사해독틀(open reading frame)을 가지고 있었으며, 6개의 엑손(exon)과 5개의 인트론(intron)으로 구성되어 있음을 확인하였고, 이를 *AtCAD-H*(*Arabidopsis thaliana*cinnamyl alcohol dehydrogenase-**H**)라 명명하였다. 상기 유전자가 암호화하는 AtCAD-H 단백질의 등전점(isoelectric point)는 7.15로 나타났다(이하 유전자는 이탤릭체를 사용하여 "*AtCAD-H*" 혹은 "*AtCAD-H* 유전자"라 하고, 단백질은 "AtCAD-H" 혹은 "AtCAD-H 단백질"이라고 한다).

<67> **<실시예 2> 대장균에서 *AtCAD-H* 유전자로부터 발현되는 단백질의 정제**

<68> 2-1) 단백질의 발현 유도

<69> 상기 실시예 1-3)에서 분리한 *AtCAD-H* cDNA 전장 부위를 포함한 증폭된 DNA 단편(fragment)을 *Bam*HI 제한효소와 *Hind*III 제한효소로 절단하였으며, pCAL-n 벡터

(Stratagene, USA)의 *Bam* HI 제한효소와 *Hin* dIII 제한효소 부위에 클로닝하여 pCAtCAD-H 재조합 벡터를 제작하였다. 여기서, 상기 pCAL-n 벡터는 칼모듈린-결합 펩티드 표지(calmodulin-binding peptide tag) 서열을 포함하고 있기 때문에 상기 벡터로부터 발현되는 단백질은 칼모듈린 레진(calmodulin resin)에 의해 쉽게 분리 될 수 있다는 이점이 있다.

<70> 상기 pCAtCAD-H 재조합 벡터를 대장균에 형질전환시켜 증폭한 후, 이를 대 장균 BL21-Gold(DE3)(Stratagene, USA)에 재형질전환시켰다. 100 μ g/ml 암피실린 (ampicillin)이 포함된 LB(Luria-Bertani broth, USB, USA) 배지에서 O.D.600 값이 0.7이 될 때까지 37 $^{\circ}$ C에서 150rpm으로 교반 배양하였다. 목표 단백질의 대장균 세포내 발현을 유도하기 위하여, 상기 현탁액에 IPTG(isopropyl-D-thiogalactoside)를 최종 농도 1mM이 되도록 첨가한 후에 2시간 더 배양하였다. 배양된 세포를 50mM MgSO₄ 와 0.4M NaCl이 용존된 50mM-포타슘 포스페이트 버퍼 (potassium phosphate buffer, pH 7.0)로 세척한 후, 다시 4,000xg에서 15분 동안 원심 분리하였고, 침전물을 모아 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

<71> 2-2) 단백질의 정제

<72> 상기 실시예 2-1)에서 얻은 세포 침전물을 CaCl₂ 결합 버퍼(binding buffer; 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 10mM β -mercaptoethanol, 1.0mM magnesium acetate, 1.0mM imidazole, 2mM CaCl₂)에 현탁하였다. 상기 세포 현탁액에 라이소자 임(lysozyme)을 최종 농도가 200 μ g/ml이 되도록 첨가하고, 15분 동안 회전시킨 후,

30초 동안 초음파분쇄를 수행하였다. 분쇄된 시료를 5분 동안 얼음에서 냉각시켰고, 이러한 과정(초음파분쇄 후 냉각)을 3회 반복 실시하였다. 상기 시료를 10,000xg에서 5분 동안 원심분리하였고, 상층액을 모아 칼모듈린 어피니티 크로마토그래피(calmodulin affinity chromatography)를 이용하여 정제하였다. 즉, 평형화된 칼모듈린 어피니티 레진(equilibrated calmodulin affinity chromatography resin)에 상기 상층액(조추출물)을 적용하였고, 4℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 레진에 붙지 않은 단백질 및 다른 물질들은 제거하기 위하여 CaCl_2 결합 버퍼로 컬럼을 세척하였고, 칼모듈린이 결합된 단백질을 용출버퍼(elution buffer; 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM β -mercaptoethanol, 2mM EDTA, 150mM NaCl)를 이용하여 컬럼 매트릭스(column matrix)로부터 분리하였다. 대조군으로는 pCAL-n 벡터로 형질전환된 대장균의 조추출물로부터 분리된 단백질을 사용하였다.

<73>

상기 단백질의 정제를 확인하기 위하여, pCatCAD-H 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 현탁액과 이로부터 분리된 대장균 용출액의 크로마토그래피 분액(fraction) 중 1번 분액부터 13번 분액을 대상으로 SDS-PAGE 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 1에 도시된 바와 같이, pCatCAD-H 재조합 벡터로 형질전환된 대장균으로부터 분리된 분액들 중 4번 분액부터 9번 분액에서 단백질의 양이 가장 높게 나타났음을 알 수 있었으며, pCatCAD-H 재조합 벡터로 형질전환된 대장균에서 분리된 용출액이 39.6kDa 크기의 융합 단백질(*AtCAD-H* 유전자로부터 발현되는 단백질의 분자량 35.6kDa + 칼모듈린 결합 펩티드의 분자량 4kDa)을 포함하고 있음을 확인할

수 있었다. 반면, 대조균 대장균의 용출액에서는 상기 크기의 단백질을 포함하고 있지 않음을 확인할 수 있었다(데이터는 나타나 있지 않음).

<74> 한편, 도 1에서, M은 마커를 가리키며, 화살표(←)는 39.6kDa 크기의 융합 단백질을 가리키기 위한 것이다. 그리고 레인 S는 *AtCAD-H* 유전자가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 대장균으로부터 얻어진 상등액에 대한 것이고, 레인 P는 *AtCAD-H* 유전자가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 대장균으로부터 얻어진 불용성 (insoluble) 단백질에 대한 것이며, 레인 B는 칼모듈린 어피니티 크로마토그래피에서 용출버퍼로 용출하기 직전 상태의 분액에 대한 것이다. 또한 레인 1 내지 13은 각각 *AtCAD-H* 유전자가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 대장균 용출액의 1 내지 13번 분액에 대한 것이다.

<75> <실시예 3> 단백질의 효소활성도 분석

<76> 상기 분리된 단백질이 리그닌 생합성에 관여하는 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 갖고 있는지 확인하기 위하여 코니페알데히드를 기질로 사용하여 효소 활성도를 측정하였으며, 본 효소가 가역 반응에 대해서도 기능을 갖고 있는지를 확인하기 위하여 코니페릴 알콜을 기질로 사용하여 역반응에 대한 효소 활성도를 측정하였다.

<77> 상기 단백질의 효소 활성도는 37℃로 조절되는 마이크로 플레이트 리더(Bio-rad Benchmak Microplate Reader)를 사용하여 405nm에서 미첼(Mitchell *et al.* *Planta*, 208: 31-47, 1999)등의 방법에 의해 측정하였다. 효소의 정반응 활성 측정

을 위한 반응액 200ml에는 100mM 트리스버퍼용액(Tris-HCl, pH 9.3), 100mM NADPH, 상기 실시예 2-2)에서 정제된 단백질 2-3 μ g이 포함되어 있고, 효소의 역반응 활성 측정을 위한 반응액 200ml에는 100mM NADPH를 제하고 100mM NADP⁺가 포함되도록 하였고 그 외의 조건은 정반응과 같다. 정반응의 경우, 기질 농도별 코니페알데히드를, 그리고 역반응의 경우, 기질 농도별 코니페릴 알콜을 각 반응용액에 첨가하여 효소 활성을 측정하였다. 효소활성 측정을 위한 대조군으로는 상기 정제된 단백질을 제외한 다른 성분들이 함유된 웰(well)을 사용하였다.

<78> 상기 정제된 단백질의 효소 활성도는 기질 100mM 코니페알데히드에 대한 미카엘리스-멘텐 키네틱스(Michaelis-Menten kinetics)에 적합하였으며, 기질 각 농도 변화에 따른 반응속도를 측정하여, 이중역수 도표(Lineweaver-Burk's plot)로 나타낸 결과(도 2a 참조), K_m 값 및 V_{max} 값이 1.98×10^{-5} M 및 0.238로 나타났다. 이러한 결과는 *AtCAD-H* 유전자로부터 발현되는 단백질이 신남알데히드 중 코니페알데히드에 대한 기질 특이성을 갖는 신나밀 알콜 탈수소화 효소임을 나타내었다.

<79> 또한, 상기 정제된 단백질의 효소 활성도는 역반응 기질 100mM 코니페릴 알콜에 대해서도 미카엘리스-멘텐 키네틱스(Michaelis-Menten kinetics)에 적합하였으며, 기질 각 농도 변화에 따른 반응속도를 측정하여, 이중역수 도표(Lineweaver-Burk's plot)로 나타낸 결과(도 2b 참조), K_m 값 및 V_{max} 값이 각각 3.7×10^{-4} M 및 0.102로 나타났다. 이러한 결과는 정반응에 있어서의 기질 친화도가 역반응의 그것보다

높음을 의미하며, 이러한 사실은 AtCAD-H 단백질이 리그닌 생합성에 있어서 신나밀 알콜의 적정농도 유지를 위한 자가 조절(self-regulation) 능력을 가진다는 가능성을 제시하며, 따라서 본 단백질이 리그닌 생합성에 있어서 아주 중요한 역할을 담당한다고 역설할 수 있다. 한편, 본 단백질의 최적 pH 연구에서 정반응과 역반응에 있어서 최적 pH 범위는 큰 차이가 없었다(data not shown). 이러한 사실은 본 단백질의 정·역반응의 기질에 대한 작용이 생체 내 pH의 변화에 대해서 큰 영향을 받지 않는다는 것을 시사한다.

<80> **<실시예 4> *AtCAD-H* 유전자에 대한 안티센스 구성체(construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 특성 분석**

<81> 4-1) *AtCAD-H* 유전자에 대한 안티센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조

<82> 상기 실시예 2-2)에서 정제한 단백질의 생리학적 특성을 확인하기 위하여 *AtCAD-H* 유전자가 안티센스방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *AtCAD-H* 전사체 발현을 억제하였다.

<83> 서열번호 5로 표시되고, 제한효소 *Bgl* II의 서열이 포함된 정방향 프라이머 및 서열번호 6으로 표시되고, 제한효소 *Xba*I의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 *AtCAD-H* cDNA를 안티센스 방향으로 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 *Bgl*II와 *Xba*I으로 절단하고, 발아시기에 식물체의 치사를 피하기 위하여 스트레스 또는 노화관련 유전자인 *sen1* 프로모터의 조

절을 받도록 제작한 pSEN 벡터에 클로닝하여 *AtCAD-H* 유전자에 대한 안티센스 구성체인 pSEN-antiAtCAD-H 재조합 벡터를 제작하였다. 상기에서 *sen1* 프로모터는 식물의 생장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

<84> 한편, 도 3에 pSEN 벡터와 pSEN-antiAtCAD-H 재조합 벡터의 구성이 도시되어 있다. 도 3에서 (a)에 도시된 것은 pSEN 벡터의 구성이고, (b)에 도시된 것은 pSEN-antiAtCAD-H 재조합 벡터의 구성이다. 도 3에서 BAR는 바스타 제초제에 대한 저항성을 부여하는 *bar* 유전자(phosphinothricin acetyltransferase gene)를 가리키고, RB는 오른쪽 경계(Right Border), LB는 왼쪽 경계(Left Border), P35S는 CaMV 35S RNA의 프로모터, 35S poly A는 CaMV 35S RNA poly A, PSEN은 *sen1* 프로모터, Nos polyA는 노파린 합성 유전자(nopaline synthase gene)의 polyA를 가리킨다.

<85> 상기 pSEN-antiAtCAD-H 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)에 일렉트로포레이션(electroporation)방법을 이용하여 도입시켰다. 형질전환된 아그로박테리움 배양액을 28℃에서 O.D.₆₀₀ 값이 1.0이 될 때까지 배양하였고, 25℃에서 5,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포를 최종 O.D.₆₀₀ 값이 2.0이 될 때까지 IM(Infiltration Medium; 1X MS SALTS, 1X B5 vitamin, 5% sucrose, 0.005% Silwet L-77, Lehle Seed, USA) 배지에 현탁하였다. 4주된 애기장대를 진공 챔버(vacuum chamber)에 있는 아그로박테리움 현탁액에 침지시키고, 10분 동안 10^4 Pa의 진공하에 두었다.

침지 후, 애기장대를 24시간 동안 폴리에틸렌 백(polyethylene bag)에 두었다. 이후, 형질전환된 애기장대를 계속 성장시켜 종자(T1)를 수확하였다. 대조군으로는 형질전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 및 안티센스 *AtCAD-H* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

<86> 4-2) T1 형질전환 애기장대의 특성 분석

<87> 상기 실시예 4-1)에서와 같이 형질전환된 애기장대에서 수확한 종자는 0.1% 바스타(Basta) 제초제(경농, 한국) 용액에서 30분 동안 침지시키고 배양함으로써 선별하였다. 형질전환된 애기장대는 대조군(pSEN 벡터로 형질전환된 애기장대)과 비교하여 볼 때, 안티센스 방향으로 *AtCAD-H* 유전자가 도입된 형질전환 애기장대의 종자에서 자란 묘목인 *Atcad-H1*은 심각하게 생장이 지체되고, 진한 녹색으로 착색 현상이 일어났으며(도 4a 참조), *Atcad-H6*는 상기에서 언급한 바와 같이 심각하게 생장이 지체되며, 그 외에도 잎의 형태적 변화(시듦 현상)가 유발되었다(도 4b 참조). 이와 같이 표현형 변화에 있어서 두 라인에 약간의 차이가 있는 것은 본 유전자에 대한 변이체의 안티센스 효과의 차이에 기인하는 것 같다. 이후 이러한 형질전환 애기장대는 개화 및 종자 생산에 있어서 치명적인 손상을 입었다. 또한 본 연구자들은 본 유전자의 유전자 사일런싱(gene silencing)이 일어난 T-DNA 태깅(tagging), 녹 아웃(knockout) 돌연변이체에서도 이와 같은 표현형의 변화를 관찰할 수 있었다(테이타는 나타나 있지 않음).

【발명의 효과】

<88> 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면, 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드, 그 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터, 이러한 재조합 벡터로 형질 전환된 형질전환체, 식물의 생장을 억제하는 방법, 식물의 생장을 억제하는 물질의 스크리닝 방법, 및 상기 스크리닝 방법을 통하여 얻어진 물질을 포함하는 식물의 생장 억제용 조성물을 제공할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하기 (a), (b) 및 (c) 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택되는, 신나밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가지는 폴리펩티드.

(a) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드;

(b) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드;

(c) 상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드

【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 신나밀 알콜 탈수소화 효소는 코니퍼알데히드에 대한 기질 특이성을 갖는 효소인 것을 특징으로 하는, 신나밀 알콜 탈수소화 기능을 가지는 폴리펩티드.

【청구항 3】

제1항에 있어서,

상기 실질적으로 유사한 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 60 % 이상의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는, 신나밀 알콜 탈수소화 기능을 가지는 폴리펩티드.

【청구항 4】

제1항에 있어서,

상기 실질적으로 유사한 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 70 % 이상의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는, 신나밀 알콜 탈수 소화 기능을 가지는 폴리펩티드.

【청구항 5】

제1항에 있어서,

상기 실질적으로 유사한 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 80 % 이상의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는, 신나밀 알콜 탈수 소화 기능을 가지는 폴리펩티드.

【청구항 6】

제1항에 있어서,

상기 실질적으로 유사한 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 90 % 이상의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는, 신나밀 알콜 탈수 소화 기능을 가지는 폴리펩티드.

【청구항 7】

제1항에 있어서,

상기 실질적으로 유사한 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 95 % 이상의 서열 상동성을 가지는 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는, 신나밀 알콜 탈수소화 기능을 가지는 폴리펩티드.

【청구항 8】

제1항 내지 제7항 기재의 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

【청구항 9】

제8항 기재의 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드.

【청구항 10】

제8항 기재의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

【청구항 11】

제10항 기재의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

【청구항 12】

제11항에 있어서,

상기 형질전환체는 형질 전환된 대장균인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

【청구항 13】

서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 또는 그와 유사한 서열로 이루어진 신나
밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가진 폴리펩티드의 발현 또는 그 기능을 억제하는
단계를 포함하는, 식물의 생장을 억제하는 방법.

【청구항 14】

제13항에 있어서,

상기 단계는 제9항 기재의 안티센스 뉴클레오티드를 식물체내에 도입하는 단
계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제하는 방법.

【청구항 15】

제13항에 있어서,

상기 단계는, 제9항 기재의 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터
를 식물체내에 도입하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제
하는 방법.

【청구항 16】

제13항에 있어서,

상기 단계는 제9항 기재의 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 식물체내에 도입하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제하는 방법.

【청구항 17】

제13항에 있어서,

상기 단계는 제9항 기재의 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스를 식물체내에 도입하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제하는 방법.

【청구항 18】

제13항에 있어서,

상기 단계는 유전자 제거, 유전자 삽입, T-DNA 도입, 동종 재조합, 트랜스포 전 태깅 및 siRNA으로 구성된 군에서 선택된 어느 한 가지 방식에 의하여 수행되는 것임을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제하는 방법.

【청구항 19】

서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 또는 그와 유사한 서열로 이루어진 신나
밀 알콜 탈수소화 효소 기능을 가진 폴리펩티드의 발현 또는 그 기능을 억제하는
물질을 검출하는 단계를 포함하는, 식물의 생장을 억제하는 물질의 스크리닝 방법.

【청구항 20】

제19항에 있어서,

상기 물질은 제11항 기재의 안티센스 뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는,
식물의 생장을 억제하는 물질의 스크리닝 방법.

【청구항 21】

제19항에 있어서,

상기 물질은, 제11항 기재의 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터
인 것을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제하는 물질의 스크리닝 방법.

【청구항 22】

제19항에 있어서,

상기 물질은, 제11항 기재의 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터
로 형질전환된 형질전환체인 것을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제하는 물질을

스크리닝 하는 방법.

【청구항 23】

제19항에 있어서,

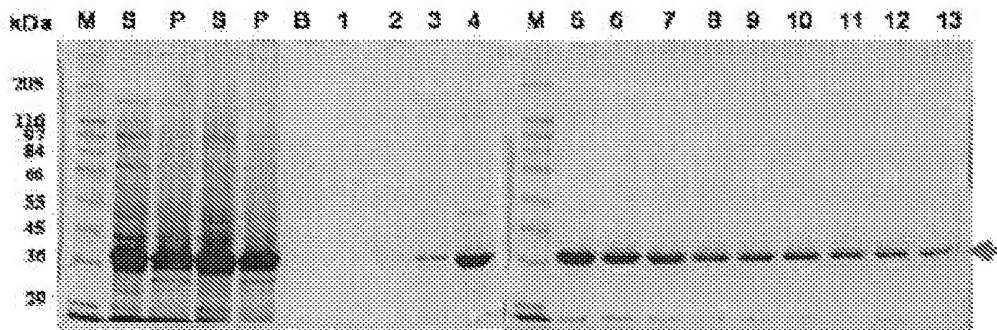
상기 물질은, 제11항 기재의 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 아그로박테리움 튜머파시엔스인 것을 특징으로 하는, 식물의 생장을 억제하는 물질을 스크리닝 하는 방법.

【청구항 24】

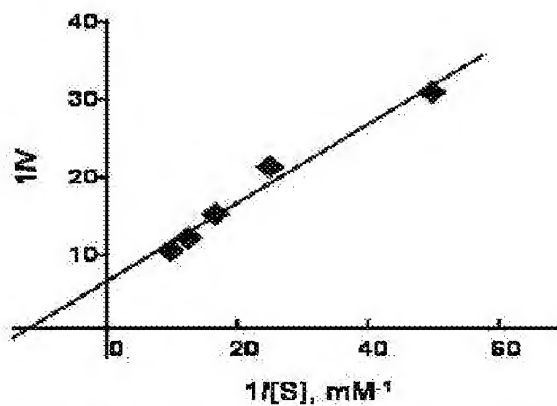
제19항 내지 제23항의 방법에 의하여 스크리닝된 물질을 포함하는, 식물의 생장 억제용 조성물.

【도면】

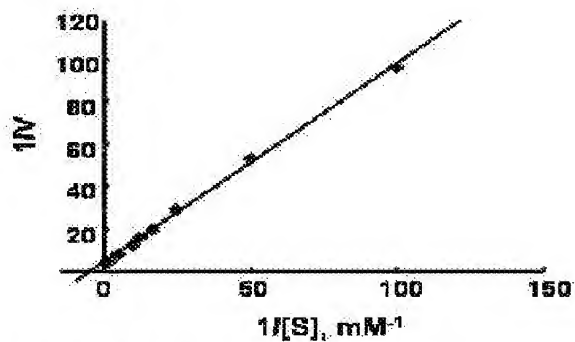
【도 1】



【도 2】

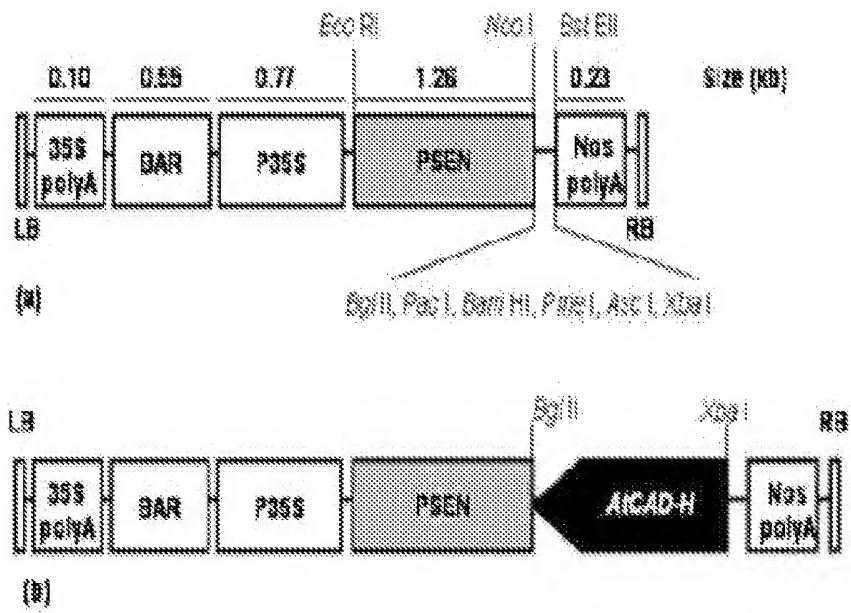


(a) CAD kinetics (coniferaldehyde → coniferyl alcohol)

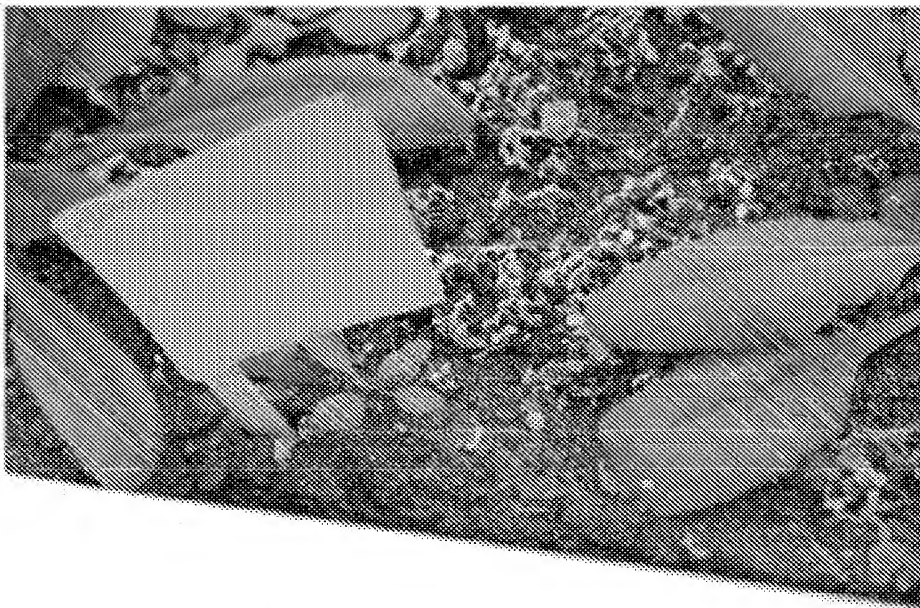


(b) CAD kinetics (coniferyl alcohol → coniferaldehyde)

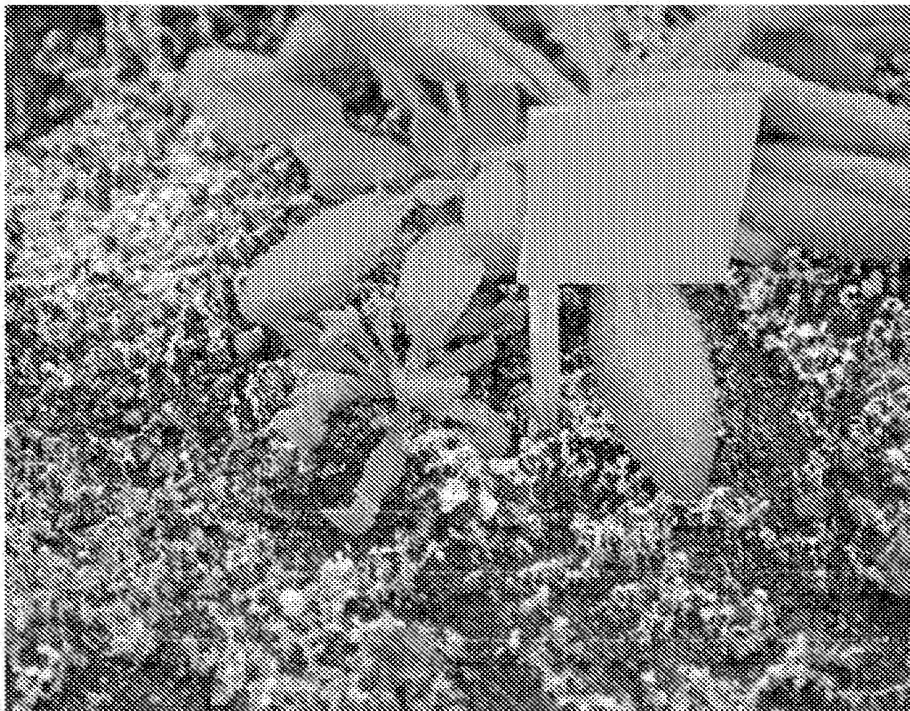
【도 3】



【도 4a】



【도 4b】



【서열목록】

<110>	GENOMINE INC. KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY	
<120>	Polypeptide Having Function of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase, Polynucleotide Coding the Polypeptide and Their Use	
<160>	6	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	1205	
<212>	DNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	1	
	acgcattcgt catttgggcc ctccacttag agagaagcag acagaacata actaaaatcg	60
	agaaaaatgg caaacagtgg tgaaggtaaa gtggtgtgtg taacaggagc ctccggttac	120
	atcgctcat ggctcgtaa gttcctactt agccgtggct acactgttaa ggctccgtc	180
	cgtgatccca gtgateccga aaagacacaa cacttagttt cactagaagg tgcaaaggaa	240
	agacttcact tgttcaaagc agacctttt gaacaagggt ctttcgactc tgctattgat	300
	ggttgccatg gagttttcca cactgcttct ccatttttta atgatgcca agaccacag	360
	gctgaactta ttgatectgc ggtcaagggg acgcttaacg ttttgaattc gtgcgcaaa	420
	gcctcttcgg ttaagagggt tgttgtaacc tctccatgg ctgccgttg ttacaatgga	480
	aaaccacgca cacctgatgt taccgtgat gaaacttgg tctctgatcc tgagcttgc	540
	gaggcctcca agatgtgta tgttctatcc aagacttgg cggaagatgc agcttgaaa	600
	ctcgctaaag agaaaggctt agacattgtt actattaacc cggctatggt gatcggtcct	660
	ctcctacagc caactctgaa cagagtgtc gctgctatat taaacttaat caatggtgca	720
	aagactttcc caaacttgag tttcgatgg gttaatgtaa aagacgtagc caatgcgcac	780
	atccaaacat ttgaggtccc ttacgcta atggcggttatt gtttggtcga gcgtgtcgtt	840
	caccactccg agattgttaa cattctacgt gagctttacc caaatctccc actacctgaa	900
	aggtgtgtgg acgagaatcc ctacgtgcca acgtatcaag tgtccaagga taaaacgagg	960
	agccttgcca tagactacat acccttgaag gttagcatca aggagaccgt cgagtccttg	1020
	aaggaaaaag gtttcgcaca gttctgagaa agcatttgag ccaatggatt taatccagat	1080
	tagataaagt atttgaaga ctatttcaaa aataatattt ggaacatgtc aatgtttca	1140
	aggagatatt agtatgttct tgtgtacttt attgtgttc catcaaatga gttactttc	1200
	ctttt	1205
<210>	2	

<211> 326

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Ala Asn Ser Gly Glu Gly Lys Val Val Cys Val Thr Gly Ala Ser

1 5 10 15 Gly Tyr Ile Ala Ser Trp Leu Val Lys Phe Leu
Leu Ser Arg Gly Tyr

20 25 30
Thr Val Lys Ala Ser Val Arg Asp Pro Ser Asp Pro Lys Lys Thr Gln

35 40 45
His Leu Val Ser Leu Glu Gly Ala Lys Glu Arg Leu His Leu Phe Lys

50 55 60
Ala Asp Leu Leu Glu Gln Gly Ser Phe Asp Ser Ala Ile Asp Gly Cys

65 70 75 80
His Gly Val Phe His Thr Ala Ser Pro Phe Phe Asn Asp Ala Lys Asp

85 90 95
Pro Gln Ala Glu Leu Ile Asp Pro Ala Val Lys Gly Thr Leu Asn Val

100 105 110
Leu Asn Ser Cys Ala Lys Ala Ser Ser Val Lys Arg Val Val Val Thr

115 120 125
Ser Ser Met Ala Ala Val Gly Tyr Asn Gly Lys Pro Arg Thr Pro Asp

130 135 140
Val Thr Val Asp Glu Thr Trp Phe Ser Asp Pro Glu Leu Cys Glu Ala

145 150 155 160
Ser Lys Met Trp Tyr Val Leu Ser Lys Thr Leu Ala Glu Asp Ala Ala

165 170 175
Trp Lys Leu Ala Lys Glu Lys Gly Leu Asp Ile Val Thr Ile Asn Pro

180 185 190
Ala Met Val Ile Gly Pro Leu Leu Gln Pro Thr Leu Asn Thr Ser Ala

195 200 205
Ala Ala Ile Leu Asn Leu Ile Asn Gly Ala Lys Thr Phe Pro Asn Leu

210 215 220
Ser Phe Gly Trp Val Asn Val Lys Asp Val Ala Asn Ala His Ile Gln

225 230 235 240
Ala Phe Glu Val Pro Ser Ala Asn Gly Arg Tyr Cys Leu Val Glu Arg

245 250 255
Val Val His His Ser Glu Ile Val Asn Ile Leu Arg Glu Leu Tyr Pro

260 265 270
 Asn Leu Pro Leu Pro Glu Arg Cys Val Asp Glu Asn Pro Tyr Val Pro
 275 280 285
 Thr Tyr Gln Val Ser Lys Asp Lys Thr Arg Ser Leu Gly Ile Asp Tyr
 290 295 300
 Ile Pro Leu Lys Val Ser Ile Lys Glu Thr Val Glu Ser Leu Lys Glu
 305 310 315 320
 Lys Gly Phe Ala Gln Phe
 325

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sense Primer

<400> 3

aaggatccat ggcaaacagt ggtgaaggta aagtg 35

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti Sense Primer

<400> 4

cgaagctttc agaactgtgc gaaacctttt tcctt 35

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sense Primer

<400> 5

gaagatctca gaactgtgcg aaaccttttt c 31

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense Primer

<400> 6

gctctagatg gcaaacagtg gtgaaggta

29